تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
مهر – آبان
۱۳۸۹
شماره ۶۸

ارزش تشخیصی آلفا- یک آنتی تریپسین

لعیا تکبیری

عضو هینت علمی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

آلفا یک آنتی تریپسین مهار کننده پروتئازی از خانواده سرپین ها و در عین حال یک پروتئین فاز حاد می باشد. نقش اصلی آن تعدیل اثرات سوء التهاب است که از راه تخریب الاستاز تولید شده توسط سلول های التهابی انجام می پذیرد. نقص ژنتیکی آلفا یک آنتی - تریپسین اصلی ترین عارضه کلینیکی مرتبط با این فاکتور می باشد.
متاسفانه بیماران مبتلا به این عارضه در بیشتر مواقع مورد شناسایی قرار نمی گیرند ویا با تشخیص نادرست تحت درمان قرار می گیرند. از آنجایی که تشخیص آزمایشگاهی اصلی ترین راه شناسایی این بیماران است ، متن حاضر ضمن مرور ژنتیک و پاتوفیزیولوژی بیماری نگاهی دارد به تست های موجود، مزایا و معایب هر کدام و همچنین تفسیر نتایج به دست آمده .

آلفا- یک آنتی تریپسین چیست ؟

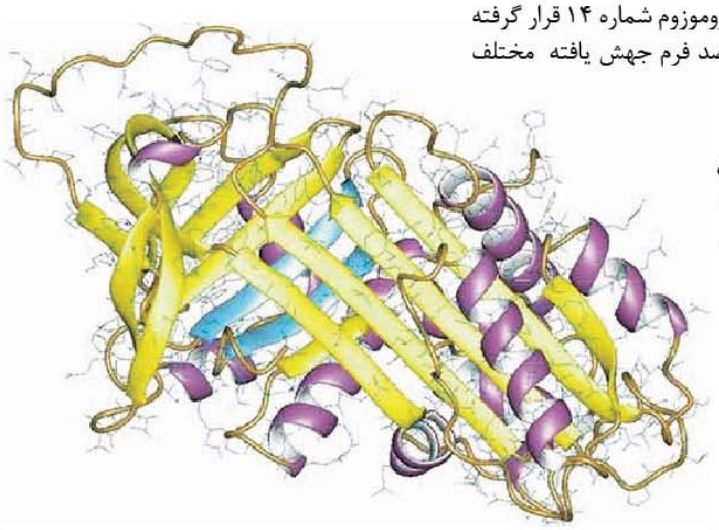
آلفا یک آنتی تریپسین یک مهار کننده پروتئازی از خانواده سرپین ها می باشد. نام های دیگر آن مهار کننده سرمی تریپسین و آلفا –یک پروتئیناز اینهیبیتور است.
فاکتور فوق یک پروتئین ۵۲ کیلو دالتونی ست و در شرایط طبیعی میزان آن در سرم g/L ۱/۵-۰/۳ می باشد . هر چند طی التهاب حاد این میزان می تواند چندین برابر افزایش یابد. از همین رو این پروتئین جز پروتئین های فاز حاد رده بندی شده است و همانند دیگر پروتئین ها ی فاز حا د توسط سلول های کبدی ساخته می شود. نقش اصلی آن تخریب الاستاز می باشد.

الاستاز آنزیمی ست که طی التهاب از سلول های التهابی – از جمله نوتروفیل ها – آزاد شده و باعث شکستن الاستین می گردد.
لازم به ذکر است که الاستین از پروتئین های ساختاری بافت ریه بوده و عامل الاستیسیته این بافت می باشد.تخریب این پروتئین تحت تاثیر الاستاز منجر به آمفیزم ریوی و _ بیماری های ریوی انسدادی مزمن- COPD _ می گردد.
لذا نقش اصلی آلفا یک آنتی تریپسین محافظت از بافت ریه در مقابل اثر تخریبی الاستاز می باشد.هر چند نام آن اشاره گر توانایی اش در غیر فعال سازی تریپسین روده ای در محیط آزمایشگاه بوده و آلفا –یک نیز نشان دهنده موقعیت اش روی نوار الکتروفورز پروتئین های سرم می باشد. (۵- ۶ -۱۱)

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
مهر – آبان
۱۳۸۹
شماره ۶۸

ژنتیک آلفا- یک آنتی تریپسین

ژن مورد نظرروی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۴ قرار گرفته است.(14q 32.1) و بیش از صد فرم جهش یافته مختلف از این ژن درجمعیت های انسانی مشاهده شده است.
فرم طبیعی کد دهنده یک گلیکو پروتئین کروی ۳۹۴ اسید امینه ای است که ساختمان دوم آن حاوی 9 α هلیکس و 3 β شیت می باشد.
(شکل یک)



شکل یک

نقص ژنتیکی آلفا یک آنتی تریپسین اصلی ترین عارضه کلینیکی مرتبط با این فاکتور می باشد. برای تسهیل مطالعه می توان آلل های مورد نظر را در چهار گروه جا داد. (۱۱-۶)

الف) آلل های نرمال (M1-M6)

این آلل ها یک پروتئین دارای عملکرد طبیعی را کد دهی می نمایند و ازآنجایی که باند پروتئین های مربوطه در الکترو فورز ژل ایزو الکتریک در منطقه میانی ژل تشکیل می گردد تحت عنوان M نامیده شده اند. این افراد کاملا سالم هستند و میزان سرمی آلفا یک آنتی تریپسین در آن ها نرمال است.(۶)

ب) آلل های معیوب (N-Z و A-L)

پروتئین های کد شده توسط این گروه از ژن ها به دلیل نقص ساختاری قادر نیستند به راحتی به جریان خون راه یابند. از این رو در داخل سلول های کبدی رسوب می نمایند. میزان سرمی آلفا یک آنتی تریپسین در این افراد به مراتب کمتر از میزان نرمال است.
همان طور که اشاره شد نامگذاری این آلل ها بر مبنای نحوه حرکت پروتئین مربوطه روی صفحه ژل می باشد. گروه A-L آن هایی هستند که قبل از پروتئین M تشکیل باند می دهند و گروه N-Z نیز بعد از پروتئین فوق تشکیل باند خواهند داد.(۶)

ج) آلل های پوچ (NULL)

این آلل ها قادر به نسخه برداری نیستند و هیچ پروتئینی را کد نمی کنند. توارث هموزیگوت این آلل ها منجر به نقص ژنتیکی شدید و فقدان کامل آلفا یک آنتی تریپسین در سرم می گردد.
تاکنون در حدود ۲۰ ژن پوچ شناسایی شده است و اگرچه این گروه از بیماران بر روی صفحه ژل الکتروفورز هیچ گونه باندی تشکیل نخواهند داد ولی طبق قرار داد این آلل ها با حرف Q مشخص گشته اند. (۶)

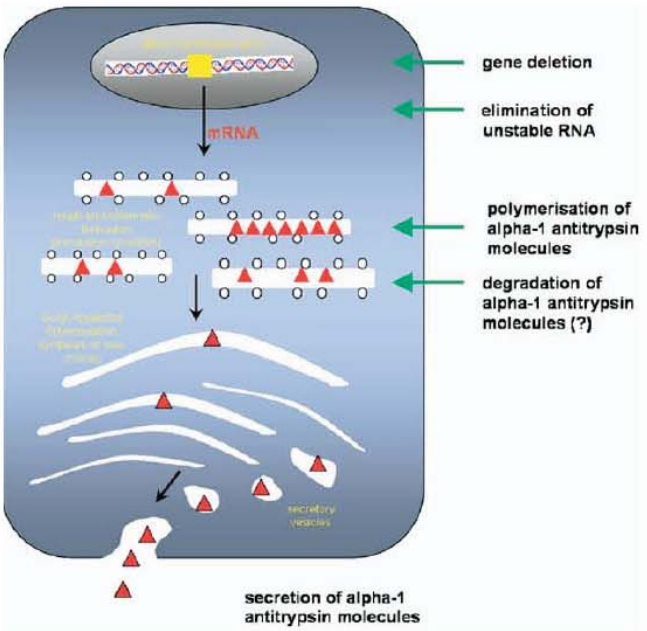
د) آلل های فاقد عملکرد

این آلل ها قادر به نسخه برداری هستند و میزان سرمی پروتئین مورد نظر نیز نرمال است . ولی متاسفانه آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده فاقد عملکرد است. (۶)
با توجه به تنوع آللی به نظر می رسد توارث آن ها از پیچدگی بالایی برخوردار باشد.در واقع اگرچه نقص آلفا یک آنتی تریپسین یک عارضه ژنتیکی مغلوب در نظر گرفته شده است ، ولی اغلب مواقع شاهد هم بارزی ژن ها هستیم .
شایع ترین ژنوتیپ های موجود به قرار زیراند :

ژنوتیپ MM : فرد کاملا سالم است و آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده ۱۰۰٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
ژنوتیپ MS : آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده ۸۰٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
ژنوتیپ MZ : آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده ۶۰٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
ژنوتیپ SS : آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده ۶۰٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
ژنوتیپ SZ : آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده ۴۰٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
ژنوتیپ ZZ : آلفا یک آنتی تریپسین تولید شده فقط ۱۵-۱۰ ٪ عملکرد فیزیولوژیک دارد.
بیش از ۹۰٪ موارد شناخته شده نقص آلفا یک آنتی تریپسین در همین گروه قرار دارند.(۶)
لازم به ذکر است ژن Z حاوی جهشی ست که طی آن در موقعیت ۳۴۲ زنجیره اسید امینه ای لیزین جایگزین گلوتامات شده است . در حالی که در ژن S جهش ایجاد شده منجر به جایگزینی والین با گلوتامات شده است.(۵- ۶ -۱۱)

نقص آلفا یک آنتی تریپسین و مشکلات تشخیصی آن

همچنان که اشاره شد.اصلی ترین وضعیت بالینی که برای تشخیص آن اندازه گیری فاکتورفوق الزامی ست نقص آلفا یک آنتی تریپسین می باشد.
بسته به ژنوتیپ فرد بیماری می تواند خود را در شکل های متفاوتی نشان دهد. شایع ترین حالت بیمارانی هستند که ژن های معیوب را به ارث برده اند . از آنجایی که در این افراد پروتئین تولید شده به دلیل نقص ساختاری قادر به ترشح به داخل جریان خون نیست پلیمریزه شده و داخل سلول های کبدی رسوب خواهد کرد تا سرانجام دچار تخریب گردد.
در این بیماران فقط درصد ناچیزی از فاکتور ساخته شده به جریان خون راه می یابد. (شکل دو)
این افراد علاوه بر - بیماری های ریوی انسدادی مزمن - نشانگان کبدی همانند سیروز را نیز نشان خواهند داد و همچنین در معرض ریسک بالاتری برای ابتلا به کارسینوم کبدی خواهند بود.(۷)
گروه دوم آن هایی هستند که ژن های پوچ را به ارث برده اند. این بیماران علیرغم اختلالات تنفسی شدید هیچ گونه نشانگان کبدی نشان نمی دهند.
علت آن عدم تولید پروتئین و در نتیجه عدم رسوب آن در سلول های کبدی می باشد.نشانگان تنفسی عمدتا به شکل سرفه، خلط، تنگی نفس و در نهایت آمفیزم ریوی و «بیماری های ریوی انسدادی مزمن» خود را نشان می دهند.(۱)
نیاز به یادآوری است که با وجود بررسی های انجام گرفته هنوز ناشناخته های بسیاری در باره ی این بیماری وجود دارد.
برای نمونه ،به نظر می رسد ژن هایی که مورد بحث قرار گرفتند تنها ژن های موثر در روند بروز بیماری نباشند، بلکه



شکل دو: نحوه سنتز ، پلیمریزاسیون و ترشح آلفا یک آنتی تریپسین در افراد مبتلا به نقص فاکتور

به احتمال قوی ژن های زمینه ساز دیگری نیز در این میان نقش ایفا می کنند.
Dawn و همکاران ژن اینتر لوکین -۱۰ (IL-10) را به عنوان کاندید اصلی دخیل در این رابطه گزارش نموده اند. جالب این که در گذشته ارتباط این ژن با بیماری اسم نیز مورد تایید قرار گرفته است.(۳)

افزون بر آن عوامل محیطی نیز نقش بسزایی در زمان و همچنین شدت بروز نشانگان دارند.در اهمیت نقش عوامل محیطی همین بس که متذکر شویم حدود ۳۵-۱۵ ٪ از افراد واجد ژنوتیپ ZZ هرگز نشانگان بیماری را نشان نمی دهند. (۱۱)

مصرف سیگار اصلی ترین عامل محیطی ست که باعث تسریع بروز ــ بیماری های ریوی انسدادی مزمن ــ می شود .(۴) شواهدی وجود دارد که مصرف سیگار باعث اکسیداسیون متیونین در موقعیت ۳۵۸ زنجیره اسید امینه ای آلفا یک آنتی تریپسین می گردد و از آنجایی که این امینو اسید در چسباندن الاستاز به پروتئین نقش اساسی دارد دگرگونی آن باعث ایجاد اختلال در عملکرد آلفا یک آنتی تریپسین می گردد. این ضایعه می تواند در همه افراد سیگاری مشکل آفرین باشد و به نظر می رسد یکی از علت های اصلی آمفیزم در سیگاری هاست، ولی مسلم است افراد مبتلا به نقص آلفا یک آنتی تریپسین به دلیل میزان پایین فاکتور مربوطه در خون شان به مراتب آسیب پذیر تر باشند.

مشکل اساسی در مورد بیماری نقص آلفا یک آنتی تریپسین عدم تشخیص به هنگام می باشد .به راستی در صد بالایی از بیماران هرگز شناسایی نمی شوند و یا تحت زیر مجموعه مبتلایان به ــ بیماری های ریوی انسدادی مزمن ــ شناسایی و درمان می شوند. تشخیص به موقع بیماری به سه دلیل می تواند مفید باشد.

۱- تشخیص بیماری یک فرد در واقع شناسایی یک خانواده در معرض خطر می باشد

۲- اگر یک فرد مبتلا که هنوز نشانگان ــ بیماری های ریوی انسدادی مزمن ــ را نشان نداده است مورد شناسایی قرار گیرد، با برنامه درمانی و کنترلی مناسب می توان از بروز این نشانگان در آینده جلو گیری نمود و یا بروز آن ها را به تعویق انداخت.

۳-حتی در افرادی که نشانه های تنفسی ــ بیماری های ریوی انسدادی مزمن ــ را نشان داده اند درمان مناسب می تواند روند گسترش بیماری را کند ساخته و کیفیت زندگی بیمار را بهبود بخشد.(۹)

از آنجایی که این بیماری نشانگان کلینیکی منحصر به فردی را ندارد که در شناسایی بیماران به کار آید ،تنها راه قطعی تشخیص ،تشخیص آزمایشگاهی آن است که در ادامه متن بدان پرداخته می شود.

ارزش تشخیصی اندازه گیری آلفا یک آنتی تریپسین و تکنیک های مورد استفاده

برای تعیین آلفا یک آنتی تریپسین تست های زیر قابل انجام هستند:

الف: اندازه گیری سطح سرمی آلفا یک آنتی تریپسین با تکنیک الایزا ، ایمونودیفیوژن و یا تکنیک های کمی دگر.

ب- تعیین فنوتیپ فرد مشکوک با استفاده از الکتروفورز ایزو الکتریک (IFE)

ج- تعیین ژنوتیپ فرد مشکوک از راه آنالیز DNA برای ردیابی جهش های معمول .(۳،۹)

تعیین سطح سرمی آلفا یک آنتی تریپسین :

این تست آسان ترین و در دسترس ترین روش برای جستجوی بیماران است . میزان کمتر از ۵۰٪ از فاکتور فوق نشان دهنده بیماری ست. ولی این تست محدودیت های اساسی یی دارد که به قرار زیراند:

۱-با این تست افراد هترو زیگوت مورد شناسایی قرار نمی گیرند ، زیرا میزان آلفا یک آنتی تریپسین در این افراد ممکن است در محدوده نرمال قرار گیرد ویا به آن نزدیک باشد.

۲- با این تست بیمارانی که وارث ژن های فاقد عملکرد هستند تشخیص داده نمی‌شوند. زیرا سطح پروتئینی در این افراد نرمال است ، ولی همان طور که قبلا ذکر شد پروتئین های تولید شده فاقد عملکرد می باشند. خوشبختانه جهش هایی که منجر به چنین وضعیتی گردند نادر اند.

۳- این تست نوع جهش را مشخص نمی کند.(۱۰)

۴- این تست بهتر است همراه با اندازه گیری CRP انجام پذیرد.زیرا از آنجایی که آلفا یک آنتی تریپسین یک پروتئین فاز حاد می باشد. ممکن است در یک وضعیت التهابی به دلیل افزایش تولید پروتئین یک فرد بیمار سالم تشخیص داده شود.

لذا نتیجه تست هنگامی قابل استناد خواهد بود که تست CRP نرمال باشد.(۱۰)

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
مهر – آبان
۱۳۸۹
شماره ۶۸

تعیین فنوتیپ :

این تست روش روتین تشخیص بیماران می باشدو همان طور که اشاره شد فرم های مختلف آلفا یک آنتی تریپسین نام خود را از موقعیت آن بر روی صفحه ژل ایزو الکتریک گرفته است. ولی این تکنیک نیز محدودیت هایی دارد از جمله:

۱- با این تست دست بالا می توان ۳۰ جهش را تعیین نمود و تفسیرژل های به دست آمده بسیار دشوار بوده و نیاز مند متخصص کار آزموده و دقیق است.

۲- چون جهش های پوچ هیچگونه پروتئینی را کد نمی کنند با این روش قابل شناسایی نیستند، ولی برعکس حالت پیشین پروتئین های فاقد عملکرد قابل تعیین اند.(۱۰)

تعیین ژنوتیپ :

این تست اگرچه به مراتب از بقیه دقیق تر است ،ولی دارای موارد منفی کاذب فراوان است. با توجه به امکانات موجود در حال حاضر با این تکنیک فقط جهش های عمده از قبیل Z و S قابل رد یابی هستند. لذا بیمارانی که واجد جهش های به غیر از این دو هستند نرمال تلقی خواهند شد.

در واقع قطعیت این تست فقط برای سه ژنوتیپ SS، ZZ و ZS قابل استناد است. متاسفانه افراد دارای ژنوتیپ NULL که بدخیم ترین حالت بیماری است با این تکنیک سالم تشخیص داده خواهند شد. برای نمونه ژنوتیپ NULL Z که بیماری در یک وضعیت بحرانی است ،MZ گزارش خواهد گردید که پیش آگهی به مراتب بهتری دارد .(۱۰)

برپایه ی داده های بالا ، بدیهی ست انجام هر کدام از تست های بالا به تنهایی نخواهد توانست اطلاعات کافی برای تشخیص قطعی بیماری را در اختیار پزشک قرار دهد .

از این رو توصیه می شود که هر سه تست هم زمان انجام پذیرند و نتایج به دست آمده در مقایسه با همدیگر تفسیر شوند.

اخیرا Synder و همکاران برای دستیابی به تشخیص قطعی در کوتاه ترین مدت، نموداری را به عنوان دستور کار پزشکان و متخصصین آزمایشگاهی پیشنهاد کرده اند (نمودار ۱).

برپایه این نمودار گام نخست برای بیمار مشکوک که برای نخستین بار به آزمایشگاه مراجعه کرده است، اندازه گیری میزان سرمی آلفا یک آنتی تریپسین و تعیین ژنوتیپ می باشد.

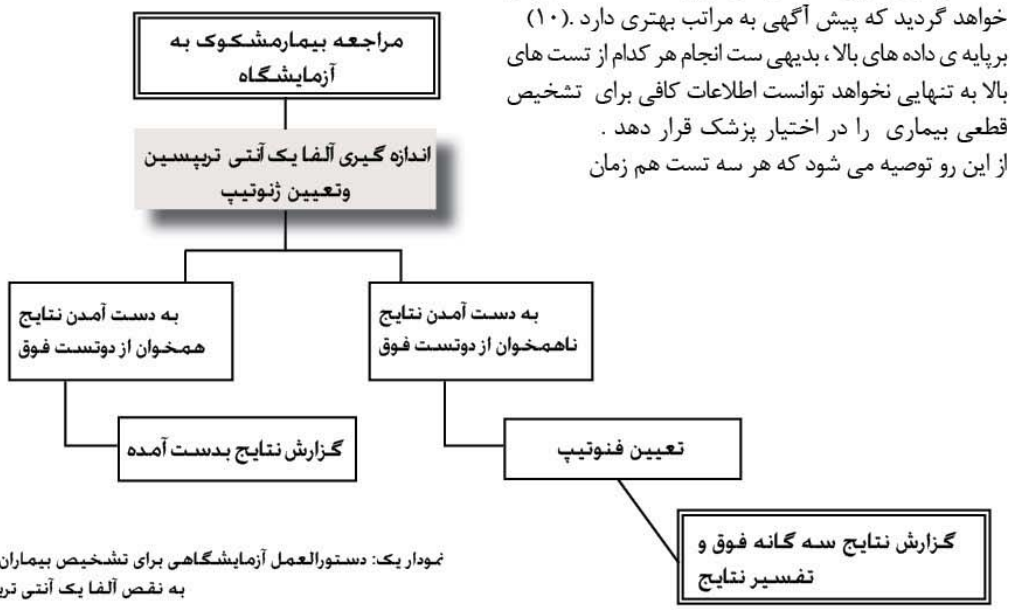
اگر نتایج به دست آمده از این دو تست با هم دیگر همخوانی داشت می توان با استناد به همان نتایج به تشخیص قطعی دست یافت. در غیر این صورت تعیین فنوتیپ بیمار الزامی است.(۹) نتایج همخوان به قرار زیر است.

ژن Z و S هر دو منفی همو زیگوت. غلظت آلفا یک آنتی تریپسین در چنین فردی باید بیشتر از g/L ۱ باشد.

ژن Z یا S مثبت هتروزیگوت . غلظت آلفا یک آنتی تریپسین در چنین فردی باید بیشتر از g/L ۷/. باشد.

ژنوتیپ Z Z . غلظت آلفا یک آنتی تریپسین در این فرد بیمار باید کمتر از g/L ۷/. باشد.

ژنوتیپ S S . غلظت آلفا یک آنتی تریپسین در این فرد بیماربابد کمتراز g/L ۱ باشد.



نمودار یک: دستورالعمل آزمایشگاهی برای تشخیص بیماران مبتلا به نقص آلفا یک آنتی تریپسین

افراد کاندید برای انجام تست آلفا یک آنتی تریپسین

همچنان که گفته شد، بخش بزرگ بیماران مبتلا به نقص آلفا یک آنتی تریپسین یا مورد شناسایی قرار نمی گیرند ویا تشخیص اشتباه در موردشان انجام می پذیرد.

از این رو برای حل مشکل انجمن های آمریکایی و اروپایی بیماری های تنفسی انجام تست آلفا یک آنتی تریپسین را در گروه های زیر توصیه می کنند.(۸-۱۰-۱۱)(جدول یک)

الف) افراد مبتلا به بیماری های مزمن ریوی

ب) نوزادان مشکوک به هپاتیت

ج) بالغین مبتلا به بیماری های مزمن کبدی

د) اعضای خانواده مبتلایان به نقص آلفا یک آنتی تریپسین

Indications for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Screening
Patients with chronic pulmonary disease
Patients with neonatal hepatitis syndrome
Adults with chronic liver disease
Families in whom an index case has been identified

جدول شماره یک

درمان

اگرچه در مورد موثر بودن روش های درمانی موجود اختلاف نظر های جدی وجود دارد، رایج ترین درمان برای این بیماران تجویز داخل وریدی آلفا یک آنتی تریپسین تجاری می باشد.

میزان فاکتور تایید شده برای تزریق g ۳/۵ به طور هفتگی می باشد. (۱۱) در واقع آلفا یک آنتی تریپسین تجاری اگرچه در بدن عملکردی همانند فاکتور درونزاد دارد ، ولی از نظر ساختار دارای تفاوت هایی با نمونه سرمی ست که عمدتا مربوط به گلیکوزیلاسیون و آمیداسیون آن می باشد. برای ارزیابی این تفاوت ها نیز مناسب ترین تکنیک همان الکتروفورز ایزو الکتریک می باشد.(۲)

اخیرا تحقیقات انجام گرفته روی تجویز استنشاقی این فاکتور متمرکز گشته است که در مقایسه با تزریق وریدی شانس رسیدن فاکتور به سیستم تنفسی تحتانی را به مراتب افزایش می دهد.

References :

1- A. Bourdin, P-R. Burgel, P. Chanez, G. Garcia, T. Perez1 and N. Rochee. Recent advances in COPD: pathophysiology, espiratory physiology and clinical aspects, including omorbidities. Eur Respir Rev.2009.18(114) : 198-212

2- Daniel Kolarich, Peter L. Turecek, Alfred Weber, Artur Mitterer, Michael Graninger,Peter Matthiessen, Gerry A.F. Nicolaes, Friedrich Altmann, and Hans Peter Schwarz. Biochemical, molecular characterization, and glycoproteomic analyses of a1-proteinase inhibitor products used for replacement therapy. Transfusion .2006.46: 1959-1977

3- Dawn L. DeMeo, Edward J. Campbell, Alan F. Barker, Mark L. Brantly, Edward Eden, N. Gerard McElvaney, tephen I. Rennard, Robert A. Sandhaus, James M. Stocks, James K. Stoller1, Charlie Strange,Gerard Turino, and Edwin K. Silverman. IL10 Polymorphisms Are Associated with AirflowObstruction in Severe a1-Antitrypsin Deficiency. Am J Respir Cell Mol Biol.2008.38:114-120

4- D.L. DeMeo E.J. Campbell M.L. Brantly A.F. Barker E. Eden N.G. McElvaney S.I. Rennard J.M. Stocks .K. Stoller C. Strange G. Turino . Heritability of Lung Function in Severe Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Hum Hered.2009.7:38-45

5- Edwin K. Silverman. and Robert A. Sandhaus Alpha1-Antitrypsin Deficiency. N Engl J Med . 2009. 360:2749-2757

6- Justin Ranes, James K. Stoller. A Review of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Semin Respire Crit Care Med .2005.26(2) :154-66

7- Kyrsten D. Fairbanks, and Anthony S. Tavill. Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review. Am J Gastroenterol 2008;103:2136-2141

8- Mark Brantly. Efficient and Accurate Approaches to the Laboratory Diagnosis of [alpha]1- Antitrypsin Deficiency. Clinical Chemistry.2006.52.(2). 2180-2181

9- Melissa R. Snyder, Jerry A. Katzmann, Malinda L. Butz, Ping Yang, D. Brian Dawson, Kevin C. Halling, W. Edward Highsmith and Stephen N. Thibodeau. Diagnosis of -1-Antitrypsin Deficiency: An Algorithm of Quantification, Genotyping, and Phenotyping. Clinical Chemistry. 2006.52:2236-2242

10- Robert A. Sandhaus . Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Whom to Test, Whom to Treat? Semin Respire Crit Care Med . 2010 . 31 (3) : 343 347

11- Thomas Köhnlein, Tobias Welte. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment.The American Journal of Medicine 2008. 121: 3-9